

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

GENOTOKSIČNI UČINAK FARMACEUTIKA NA ŠKOLJKAŠE
GENOTOXIC EFFECTS OF PHARMACEUTICALS ON BIVALVES
SEMINARSKI RAD

Petra Petrina

Preddiplomski studij Znanosti o okolišu

(Undergraduate Study of Environmental Science)

Mentor: prof.dr.sc. Mirjana Pavlica

Zagreb, 2019.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. BIOLOGIJA ŠKOLJKAŠA.....	2
3. FARMACEUTICI U OKOLIŠU	4
4. UČINAK POJEDINIH FARMACEUTIKA NA ŠKOLJKAŠE	5
4.1. Fluoksetin	5
4.2. Triklosan	10
4.3. Paracetamol.....	15
4.4. Ibuprofen.....	18
5. ZAKLJUČAK.....	20
6. LITERATURA	21
7. SAŽETAK	24
8. SUMMARY	24

1. UVOD

Farmaceutici su raznolika skupina spojeva koji se koriste u svrhu liječenja ili prevencije bolesti u ljudi, ali se također koriste i u veterini, akvakulturi i stočarstvu. To su biološki aktivne tvari koje uzrokuju specifične odgovore u ljudi i životinja. Pri stvaranju lijekova, provode se razna toksikološka istraživanja kako bi se pripremile tvari koje utječu na specifične metaboličke putove određenog organizma. Kada takve biološki aktivne tvari dospiju u okoliš, mogu utjecati na usporedljive mehanizme drugih organizama koji nisu njihova originalna meta djelovanja. Zbog razlika u fiziologiji, takvi spojevi mogu biti toksični za mnoge beskralješnjake (Lacaze i sur. 2015.).

Lijekovi i proizvodi za osobnu njegu (engl. *Pharmaceuticals and Personal Care Products*, PPCP) odnedavno su predmet istraživanja kao okolišni zagađivači. Mjerljive koncentracije stotinjak takvih spojeva izmjerene su diljem svijeta u površinskim i podzemnim vodama, moru te otpadnim vodama. Među detektiranim farmaceuticima, u vodenim okolišima dominiraju antibiotici, antidepresivi, protuupalni lijekovi, beta-blokatori i hormonski lijekovi. Kontinuirana proizvodnja, upotreba, ali i zlouporaba farmaceutika pridonose njihovom stalnom dospijevanju u vodene okoliše (Parolini i sur., 2010.). Ovakvi spojevi opstaju u vodama čak i nakon obrade i pročišćavanja otpadnih voda, što znači da se oni stalno ispuštaju u okoliš.

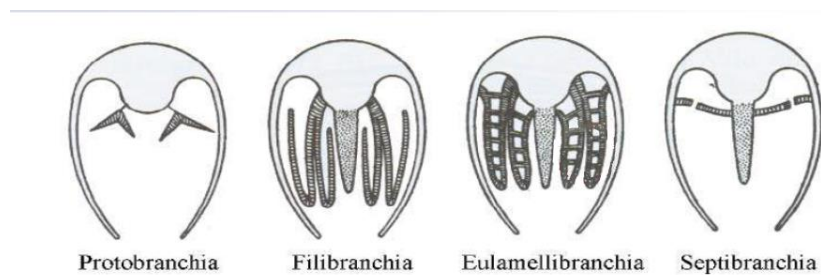
Kako su farmaceutici polarne tvari pripremljene sa svrhom da budu aktivne upravo u malim koncentracijama, to može biti ozbiljan problem za mnoge akvatičke organizme. Utjecaj takvog zagađenja je na njih značajan jer su mu izloženi tijekom cijelog životnog vijeka. Posebno osjetljiva skupina organizama su školjkaši s obzirom na to da su sesilni organizmi. Poznati učinci izloženosti farmaceuticima na školjkaše mogu se pratiti od molekularne i stanične razine, do narušavanja cjelokupnog *fitnessa* organizama. Bioakumulacija farmaceutika u školjkaša jedan je od većih problema povezanih s kroničnim izlaganjem takvim spojevima. Proučavanjem učinka PPCP-a na školjkaše možemo dobiti uvid u utjecaj antropogenog zagađenja na populacije ovih beskralježnjaka, ali i na vodene ekosustave kao cjelinu.

2. BIOLOGIJA ŠKOLJKAŠA

Školjkaši (Bivalvia) su jedan od sedam razreda unutar koljena mekušci (Mollusca). Tijelo mekušaca dijeli se na tri glavne cjeline: glavu, utrobnu vreću i stopalo. S dorzalne strane tijela preko utrobne vreće prostire se plašt (*pallium*). Epitel plašta luči proteine i vapnenački materijal koji kod većine mekušaca tvore vapnenačku ljušturu.

Razred školjkaši obuhvaća oko 25 000 vrsta koje sve žive u vodenim staništima. Školjkaši su sjedilački ili polusjedilački organizmi od kojih je većina prilagođena na život na površini mekanog sedimenta dna, dok se neki ukopavaju u sediment ili buše hodnike u stijenama ili drvetu. Karakterizira ih dvodijelna vapnenačka ljuštura koju grade tri osnovna sloja: periostrakum (vanjski proteinski sloj), oostrakum (srednji vapnenački sloj) i hipostrakum (unutarnji vapnenački sloj). Otvaranje i zatvaranje ljušture pod utjecajem je djelovanja ligamenta te mišića zatvarača.

Plašt školjkaša najbolje je razvijen od svih mekušaca. On tvori dva otvora, ulazni (dišni) te izlazni (nečisnički) otvor. Većina školjkaša diše škrgama (ktenidijama). Na temelju njihove građe, školjkaši se dijele u četiri reda: Protobranchia, Filibranchia, Eulamellibranchia i Septibranchia (Sl. 1.). (Habdija i sur., 2011.)



Slika 1. Podjela školjkaša prema građi škrge

(Prilagođeno prema Habdija i sur., 2011.)

U školjkaša je došlo do decefalizacije zbog sjedilačkog načina života te zaštićenosti tijela unutar ljuštura. Gangliji su međusobno udaljeniji nego u ostalih mekušaca te su povezani

izduljenim komisurama i konektivama. Osjetila su većim dijelom smještena na rubu plašta. Većina školjkaša u stopalu ima smještene statociste, parne ravnotežne organe. U plaštanoj šupljini nalaze se kemoreceptori osfradiji koji služe za nadziranje kvalitete vode. Ukoliko je voda zagađena, obustavlja se rad trepetljika i prolazak vode kroz škrge.

Probavni sustav prilagođen je načinu prehrane. Većina školjkaša su filtratori, što znači da filtriraju čestice i hranjive tvari iz okolne vode. Izvanstanična probava odvija se u želucu, a unutarstanična probava u probavnim žlijezdama.

Optjecajni sustav školjkaša je otvoren, a srce se sastoji od dvije pretklijetke i jedne klijetke. Kisik se tijelom prenosi hemolimfom u kojoj se nalaze hemociti. Hemolimfa se u metanefridijima oslobađa otpadnih produkata metabolizma, a u škragama se obogaćuje kisikom. Osim transporta tvari, optjecajni sustav ovih beskralješnjaka ima i ulogu hidroskeleta.

Školjkaši su većinom razdvojenog spola, a oplodnja je vanjska. Razvoj teče preko trohoforme i veliger ličinke. Kod nekih slatkovodnih školjkaša, u razvoju je pristuna nametnička ličinka glohidija koja se pričvršćuje na tijelo riba (Habdija i sur., 2011.).

Školjkaši su dobri modelni organizmi za proučavanje učinka farmaceutika iz više razloga. Kako su brojni školjkaši bitan izvor hrane ljudima, njihova fiziologija je već vrlo dobro poznata. Poznato je i da imaju mogućnost bioakumulacije toksičnih tvari zbog čega su osjetljivi i na niske koncentracije toksikanata. Kako su slabo pokretni, pogodni su za istraživanja *in situ*, na mjestu zagađenja. Većina istraživanja se izvodi na hemocitima u laboratorijskim uvjetima, *in vitro*. Hemociti školjkaša imaju brojne uloge; osim transporta hranjivih tvari, sudjeluju u popravku ljuštura i imunosnom odgovoru. Hemociti imaju mogućnost fagocitoze, mogu proizvoditi različite metabolite te otpuštati enzime (Lacaze i sur., 2015.). Kao takvi, pogodni su za proučavanje promjena u odgovoru prilikom izlaganja toksičnim tvarima. Također su pogodni kao modelni organizmi za različite testove genotoksičnosti kao što je primjerice komet-test u kojem se mjeri oštećenje DNA u stanicama nakon elektroforeze. Krajevi DNA nakon loma putuju u električnom polju prema anodi i tako nastaje struktura nalik kometu. Na temelju dužine repa kometa i intenziteta obojenja u repu kometa mjeri se stupanj oštećenja. Ovaj test zahtjeva da stanice budu razdvojene zbog čega je hemolimfa povoljna za izvođenje eksperimenata.

3. FARMACEUTICI U OKOLIŠU

Nakon biotransformacije u organizmima ljudi i životinja, farmaceutici u okoliš dospijevaju kao smjesa aktivnih tvari i njihovih metabolita. Njihovom ispuštanju u okoliš značajno pridonose i farmaceutski pogoni u kojima se proizvode. Većina farmaceutika tako uglavnom završava u vodama, bilo direktnim ispuštanjem u vodotoke ili nakon obrade otpadnih voda u kojima opstaju.

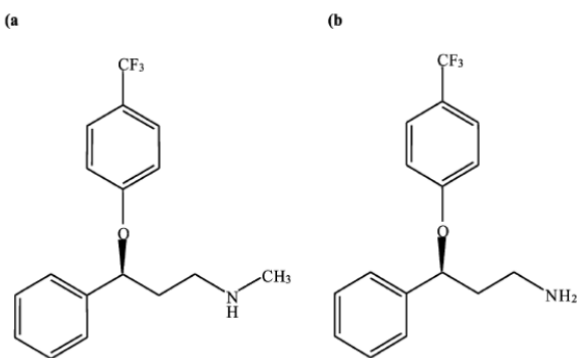
Prema podacima EINECS-a (*European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances*), trenutno je u uporabi 106 211 različitih kemikalija (Web stranica 2.). Zbog tako velikog broja kemikalija na tržištu, nemoguće je testirati djelovanje nekog farmaceutika u kombinaciji sa svakom postojećom kemikalijom u uporabi. Pri procjeni utjecaja na okoliš, problem predstavlja činjenica da su te kemikalije u okolišu u smjesi čiji je sastav nemoguće predvidjeti. Različite kemikalije različito reagiraju s drugim kemikalijama, pri čemu rezultat može biti antagonizam, pri čemu je učinak smjese kemikalija manji od zbroja njihovih pojedinačnih učinaka, zatim adicija, pri čemu je učinak smjese jednak zbroju učinaka svake kemikalije, te sinergizam, čemu je zajednički učinak kemikalija u smjesi mnogostruko veći od učinka pojedinih kemikalija (Roell i sur., 2017.). Zbog kompleksnih međudjelovanja između pojedinih spojeva, gotovo je nemoguće točno predvidjeti kako će određeni kemijski spoj reagirati kada dospije u okoliš. Uzmemo li u obzir i metabolite, koji nekada znaju biti toksičniji od same aktivne tvari, stvar postaje još kompliciranija.

Zbog njihove konstantne uporabe i brojnih izvora ulaska u okoliš, farmaceutici se u površinskim vodama mogu naći u mjerljivim koncentracijama. Kakav učinak imaju na školjkaše, pokazat ću na primjeru nekoliko često korištenih farmaceutika.

4. UČINAK POJEDINIH FARMACEUTIKA NA ŠKOLJKAŠE

4.1. FLUOKSETIN

Fluoksetin je spoj kemijske formule $C_{17}H_{18}F_3NO$ (Sl. 2.) koji se komercijalno prodaje pod imenima *Prozac* i *Sarafem*. To je antidepresiv iz skupine selektivnih inhibitora ponovne pohrane serotonina (SSRI). SSRI spojevi selektivno blokiraju ponovnu pohranu serotonina, dok na druge neurotransmitske sustave djeluju slabo ili ne djeluju uopće. Fluoksetin se koristi za liječenje depresije, opsesivno-kompulzivnog poremećaja, poremećaja hranjenja i sl. (Benfield i sur., 1986.) Otkriven je 1972. godine od strane Eli Lilly & Co., a u medicinske svrhe koristi se od 1986. godine. Metabolizira se u jetri pomoću izozima citokrom P450 sustava, uključujući CYP2D6 koji je zaslužan za pretvorbu fluoksetina u aktivni metabolit norfluoksetin.



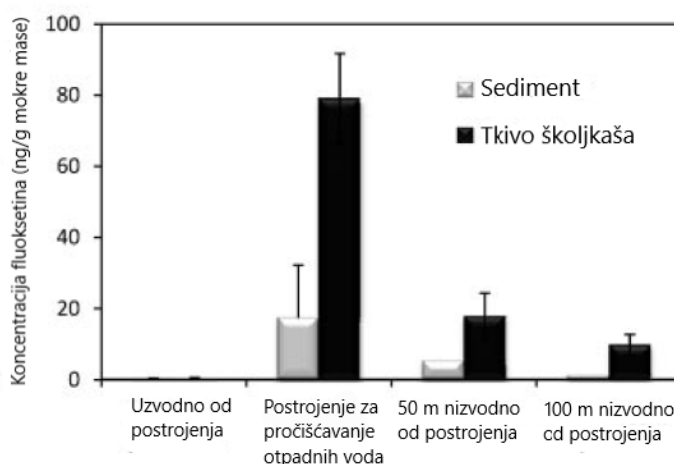
Slika 2. Strukturna formula a) fluoksetina i b) norfluoksetina

(Preuzeto iz Brooks i sur., 2003.)

Serotonin je također važan neuromodulator u školjkaša. Uključen je u određene fiziološke funkcije i ponašanja kao što je aktivnost trepetljiki škrga, sazrijevanje oocita te početak mrijesta. Većina radova o utjecaju fluoksetina na školjkaše fokusirala se na razmnožavanje i promjene u ponašanju. U radu Hazeltona i suradnika (2014.), opisano je kronično izlaganje školjkaša fluoksetinu u trajanju od 67 dana. Slatkovodni školjkaši vrste

Lampilis fasciola bili su izloženi različitim koncentracijama ovog farmaceutika *in vivo*: 0, 0,5, 2,5 i 22,3 µg/L. U usporedbi s kontrolom, životinje izložene fluoksetinu češće su imale izložen plašt, više su se kretale te su se ranije započinjale ukopavati u sediment. Dobiveni rezultati sugeriraju da dugotrajna izloženost fluoksetinu povećava aktivnost školjkaša, što vodi do smanjenja energije, te ih može činiti uočljivijima predatorima.

Bioakumulacija fluoksetina u školjkaša opisana je u nekoliko radova. U jednom radu američkih znanstvenika iz 2010. godine (Bringolf i sur., 2010.), opisano je izlaganje školjkaša fluoksetinu *in situ*. Školjkaše porodice Unionidae u kavezima su smjestili u komunalno postrojenje za pročišćavanje otpadnih voda, 50 m uzvodno i 100 m nizvodno. Nakon 14 dana izmjerena je koncentracija fluoksetina u tkivu školjkaša, ali i u vodi te sedimentu (Sl. 3.). Fluoksetin su detektirali u svim okolišnim uzorcima. Najveća koncentracija fluoksetina u tkivu školjkaša izmjerena je u samom postrojenju, a iznosila je 79,1 ng/g (mokra masa).

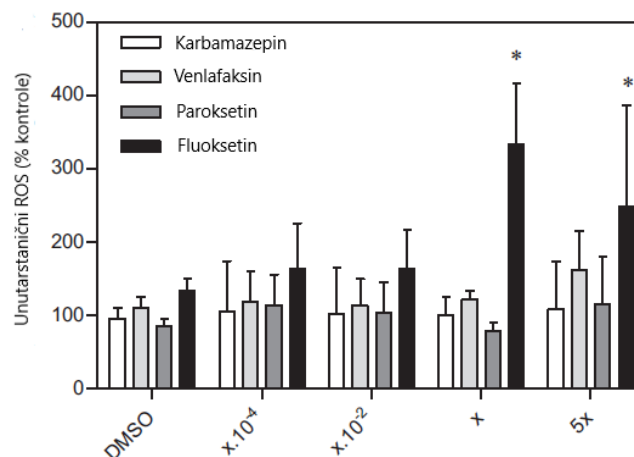


Slika 3. Srednje vrijednosti izmjerenih koncentracija fluoksetina u uzorcima sedimenta i tkiva školjkaša

(Prilagođeno prema Bringolf i sur., 2010.)

Srednje vrijednosti koncentracija fluoksetina u tkivu školjkaša snažno koreliraju s koncentracijama izmjerenima u vodi. Ta korelacija upućuje na brz unos fluoksetina u organizam putem hranjena iz suspenzije te preko škrga. Koncentracije fluoksetina izmjerene u tkivima školjkaša znatno su veće od onih izmjerenih u riba u postrojenjima za obradu otpadnih voda (raspon od 0,1 do 1,6 ng/g; mokra masa). To povećava zabrinutost znanstvenika za potencijalno štetne učinke ovog i ostalih farmaceutika na školjkaše kao već ugroženu skupinu.

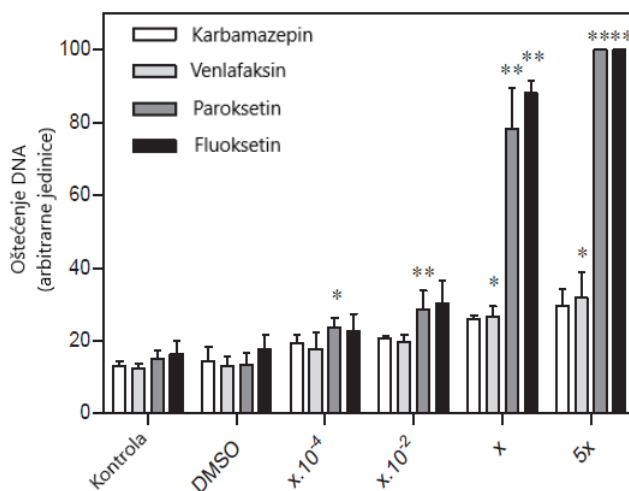
Genotoksičnim i imunotoksičnim učinkom fluoksetina na školjkaše bavi se nešto manje radova. Lacaze i sur. (2015.) u svom su radu proučavali učinak sedam različitih farmaceutika (od kojih je jedan fluoksetin) na plavu dagnju, *Mytilus edulis*. Istraživanje je rađeno na hemocitima *in vitro*. Testirane koncentracije fluoksetina iznosile su 50 (5X), 10 (X), 0,1 ($X \times 10^{-2}$) i 0,001 ($X \times 10^{-4}$) mg/L. Te koncentracije fluoksetina pripremljene su u 0,5% dimetil sulfoksidu (DMSO). Akutno izlaganje stanica fluoksetinu trajalo je 21 sat pri 15°C u mraku. Praćena je vijabilnost stanica, fagocitorna aktivnost, genotoksični učinak te produkcija reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Vijabilnost stanica provjerena je prije i nakon izlaganja fluoksetinu protočnom citometrijom. U dvije kontrolne skupine vijabilnost je ostala gotovo ista, dok se u slučaju hemocita izloženih fluoksetinu smanjila za 30% pri koncentraciji od 10 mg/L te 24% pri koncentraciji od 50 mg/L. Fagocitorna aktivnost se pri višim koncentracijama fluoksetina smanjila, dok se pri niskim koncentracijama zapravo povećala (primjer hormoneze). Produkcija reaktivnih kisikovih vrsta značajno se povećala u hemocitima izloženima fluoksetinu pri koncentracijama od 10 i 50 mg/L, što ukazuje na oksidacijski stres. Od četiri različite psihotropne tvari istraživane u tom radu, količina unutarstaničnih ROS-ova bila je najviša u hemocitima izloženima upravo fluoksetinu (Sl. 4.).



Slika 4. Količina unutarstaničnih reaktivnih kisikovih vrsta nakon izlaganja psihotropnim tvarima (* označava statistički značajnu razliku ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolnu skupinu izloženu samo 0,5% DMSO)

(Prilagođeno prema Lacaze i sur., 2015.)

Genotoksični učinak fluoksetina istražen je alkalnom verzijom komet-testa. Komet-test je biotest kojim se detektira oštećenje molekule DNA. Tijekom elektroforeze, manji fragmenti DNA koji su rezultat loma molekule putuju u električnom polju prema anodi različitom brzinom od ostatka molekule te nastaje karakterističan “rep” kometa. Što se više DNA nalazi u repu, genotoksični učinak ispitivanog spoja je veći. Postupak je učinjen prema metodi Singh i sur. (1988.) uz određene modifikacije. Nakon bojanja Sybr-zelenom, preparati su promatrani uz pomoć fluorescencijskog mikroskopa. Rezultati su, ovisno o stanju stanica, podijeljeni u pet kategorija (0- nema oštećenja, do 4- gotovo sva DNA u repu). Fluoksetin je imao genotoksični učinak na hemocite pri koncentracijama od 10 i 50 mg/L. Od četiri psihotropne tvari testirane u radu, fluoksetin je imao najveći genotoksični učinak (Sl. 5.).



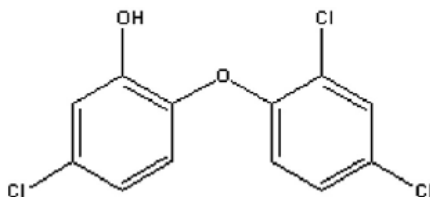
Slika 5. Oštećenje DNA detektirano komet testom nakon izlaganja psihotropnim tvarima (* označava statistički značajan porast oštećenja, $p < 0,05$ u usporedbi s DMSO kontrolonom skupinom)

(Prilagođeno prema Lacaze i sur., 2015.)

Kako su količine ROS-ova bile čak tri puta veće nakon izlaganja fluoksetinu, autori rada smatraju kako je upravo oksidacijski stres uzrok uočenih genotoksičnih i imunotoksičnih učinaka. U tom radu zaključeno je da SSRI spojevi, a posebno fluoksetin, uzrokuju genotoksičnost, citotoksičnost i imunotoksičnost pri nižim koncentracijama od antibiotika. Njihovi rezultati potkrepljuju prijašnja istraživanja u kojima je fluoksetin prepoznat kao najtoksičniji ljudski farmaceutik za vodene okoliše. Razlog tome možda leži u samoj strukturnoj formuli spoja. Kemijska struktura antidepresiva obično uključuje nekoliko potencijalno mutagenih i kancerogenih komponenata koji mogu uzrokovati oštećenje DNA (Lacaze i sur., 2015.). Ti strukturni dijelovi su aromatski prsten, nitro skupina te fluorobenzenska skupina. Iako od te tri skupine fluoksetin ima samo aromatski prsten, kemijska struktura daje nam uvid u potencijalan razlog visoke toksičnosti ovog spoja za beskrležnjake.

4.2. TRIKLOSAN

Triklosan (TCS) je aromatski spoj kemijske formule $C_{12}H_7Cl_3O_2$ s antibakterijskim i antifungalnim djelovanjem (Sl. 6.). Ima široku komercijalnu uporabu; koristi se u pastama za zube, sapunima, kozmetici, tekstilu i dezodoransima (Binelli i sur., 2009a). Triklosan je lipofilni spoj s mogućnošću bioakumulacije te na taj način može djelovati na brojne organizme kada se nađe u okolišu. Transformacijom triklosana nastaje metil-triklosan koji je relativno stabilan u okolišu. Metilacijom triklosana njegova se lipofilnost povećava, što pospješuje bioakumulaciju.



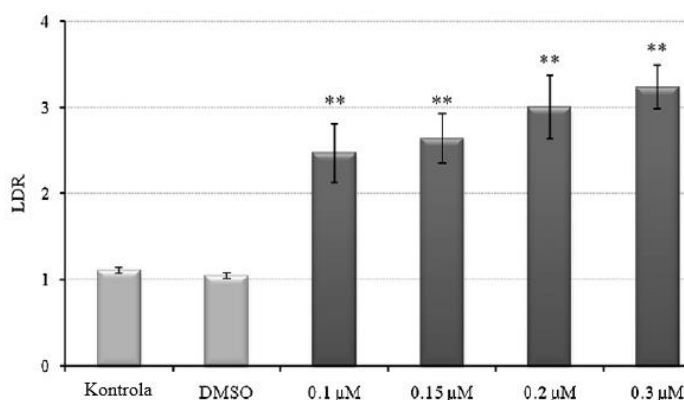
Slika 6. Strukturna formula triklosana

(Prilagođeno prema Binelli i sur., 2009a)

U nekoliko radova dokazan je toksični učinak ovog farmaceutika na alge. Upravo na temelju istraživanja na algama, određena je konvencionalna PNEC-vrijednost (engl. *predicted no effect concentration*) od 70 ng/L za slatkovodne organizme. Koncentracije triklosana na nekoliko mjesta, obično nizvodno od postrojenja za obradu otpadnih voda, nadmašivale su spomenutu PNEC-vrijednost (Binelli i sur., 2009b). Mjerljive koncentracije ovog spoja detektirane su u mnogim površinskim vodama diljem svijeta, zbog čega je počelo istraživanje učinka triklosana na akvatičke organizme.

Binelli i suradnici su u dva rada prikazali rezultate istraživanja genotoksičnog učinka triklosana na slatkovodnog školjkaša *Dreissena polymorpha* (raznolika trokutnjača) u uvjetima *in vitro* (Binelli i sur., 2009a) i u uvjetima *in vivo* (Binelli i sur., 2009b).

U istraživanju genotoksičnog učinka triklosana na hemocitima školjkaša *Dreissena polymorpha in vitro*, testirane su koncentracije TCS-a od 0,1, 0,15, 0,2 i 0,3 μM . Praćena je vijabilnost stanica i učestalost apoptoze te je osim komet-testa napravljen i test zadržavanja neutralnog crvenila. Vijabilnost stanica analizirana je nakon bojenja tripanskim modrilom dva puta prije izvođenja ostalih testova. Komet-test rađen je u alkalnoj verziji, $\text{pH} > 13$ (Singh i sur., 1988., Buschini i sur., 2003.). Preparati su bojani DAPI-bojom te pregledani pod fluorescencijskim mikroskopom. Omjer duljine repa i radijusa glave kometa (engl. *length/diameter ratio*, LDR) iznosio je oko 1 za kontrolne skupine (netretirana skupina i skupina izložena samo DMSO), što je očekivano za stanice bez oštećenja DNA. Pri svim istraživanim koncentracijama triklosana došlo je do značajnog oštećenja DNA (Sl. 7.). Visoko oštećenje ($\text{LDR} = 2,5 \pm 0,3$) uočeno je već pri najnižoj testiranoj koncentraciji TCS (0,1 μM).



Slika 7. Omjeri duljine repa / radijusa glave kometa (LDR) izmjereni za kontrolne skupine i četiri skupine izložene triklosanu

(Prilagođeno prema Binelli i sur., 2009a)

Ovisno o jačini oštećenja, jezgre tretiranih hemocita podijeljene su u 5 kategorija. Sve stanice iz dvije kontrolne skupine pripadale su u dvije najniže kategorije oštećenja, dok se količina stanica u najvišim kategorijama oštećenja povećavala s koncentracijom triklosana kojem su bile izložene (Tab. 1.).

Tablica 1. Postotak hemocita u različitim kategorijama oštećenja DNA nakon izlaganja triklosanu (minimalno oštećenje: <10% DNA u repu, malo oštećenje: 10-25%, srednje oštećenje: 25-50%, visoko oštećenje: 50-75%, ekstremno oštećenje: >50%)

(Prilagođeno prema Binelli i sur., 2009a)

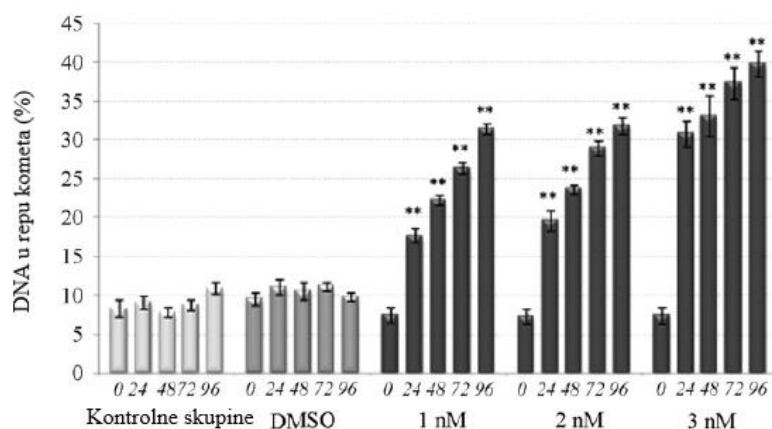
Kategorije oštećenja	Kontrola	DMSO	TRIKLOSAN			
			0.1 μ M	0.15 μ M	0.2 μ M	0.3 μ M
Minimalno	72.2	94.4	24.4	18.8	14.4	9.0
Malo	25.4	5.6	23.7	16.6	24.0	10.3
Srednje	2.4	0	31.0	34.6	38.8	37.5
Veliko	0	0	17.3	24.8	18.2	29.8
Ekstremno	0	0	3.6	5.2	4.6	13.5

Postotak stanica u apoptozi istraživao je prema metodi Singha (2000.). Preparati su također bojani DAPI-bojom i pregledani pod fluorescencijskim mikroskopom. Stanice u apoptozi karakterizira velika aureola (engl. *halo*). Nekrotične stanice se razlikuju po kružnoj, slabo vidljivoj aureoli te u ovom radu nisu bile uzimane u obzir. Kontrolne skupine imale su vrlo nizak postotak stanica u apoptozi (3,2%). Značajni porast stanica u apoptozi primjećen je već pri najnižoj testiranoj koncentraciji triklosana od 0,1 μ M, što upućuje na to da je koncentracija koja potiče apoptozu stanica znatno niža od najniže testirane u tom radu.

Test zadržavanja neutralnog crvenila radili su prema metodi Lowe i Pipe (1994.). Ovaj se test temelji na činjenici da zdrave stanice mogu unutar lizosoma zadržavati boju duže od onih izloženih toksičnim tvarima. Preparati su pregledani svjetlosnim mikroskopom, a test je bio završen kada je u barem 50% hemocita boja bila ispuštena iz lizosoma. Nije postojala značajna razlika između kontrolnih skupina i skupina tretiranih triklosanom.

Istraživanje u uvjetima *in vivo* provedeno je izlaganjem jedinki raznolike trokutnjače triklosanu u trajanju od 96 sati. Odabrane koncentracije temeljile su se na PNEC vrijednostima iz literature te su iznosile 1 nM (290 ng/L), 2 nM (580 ng/L) i 3 nM (870 ng/L). U ovom su radu, kao i u prošlom, pratili vijabilnost stanica, frekvenciju apoptoze, napravili komet-test te test zadržavanja neutralnog crvenila na hemocitima prema istim protokolima. Također je napravljen i mikronukleus-test (MN).

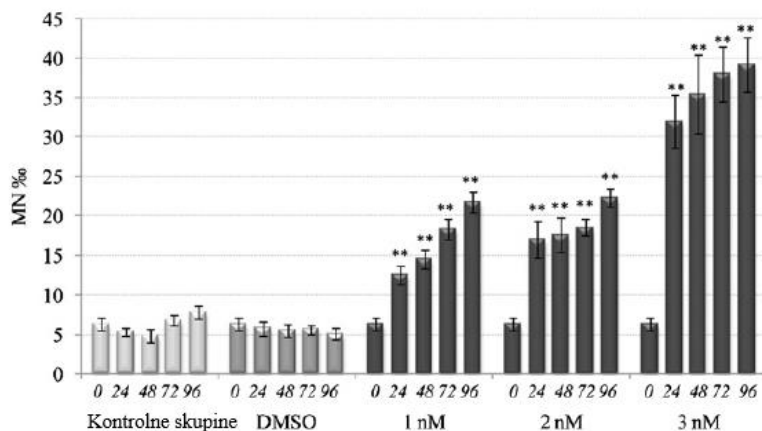
Komet-testom ponovno je utvrđen genotoksični učinak pri svim testiranim koncentracijama (Sl. 8.). Postotak DNA u repu kometa povećavao se s povećanjem koncentracije triklosana. Nakon 24 sata izlaganja, postotak DNA u repu pri različitim koncentracijama TCS bio je u rasponu od 18 do 31% što upućuje na brzi i značajni efekt genotoksičnog učinka triklosana na ove školjkaše.



Slika 8. Postotak DNA u repu kometa u ovisnosti o vremenu i koncentracijama triklosana

(Prilagođeno prema Binelli i sur., 2009b)

Postotak stanica u apoptozi također se povećavao s trajanjem izlaganja te povećanjem koncentracije triklosana. Pri najnižoj koncentraciji TCS od 1 nM, količina stanica u apoptozi povećala se 6 puta, a pri najvišoj koncentraciji od 3 nM čak 12 puta u odnosu na kontrolne skupine. Mikronukleus-test napravljen je prema metodi opisanoj u radu Pavlica i sur. (2000.). Ovaj se test zasniva na činjenici da izloženost genotoksičnim tvarima uzrokuje stvaranje mikronukleusa u blizini jezgre kao rezultat aneugenog ili klastogenog učinka. Aneugeni učinak podrazumijeva da MN nastaje od cijelog (lutajućeg) kromosoma zbog nefunkcioniranja dobenog vretena, a klastogeni da MN nastaje od odlomljenog fragmenta kromosoma. U svim uzorcima nađeno je ireverzibilno genetsko oštećenje koje se povećavalo s koncentracijama triklosana. Genotoksični potencijal triklosana vidi se iz njegovog brzog djelovanja već pri niskim koncentracijama (Sl.9.).



Slika 9. Frekvencija mikronukleusa u hemocita raznolike trokutnjače u ovisnosti o vremenu izlaganja i koncentraciji triklosana

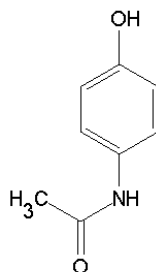
(Preuzeto iz Binelli et al., 2009b)

Zadnji test koji su proveli bio je test zadržavanja neutralnog crvenila. Za razliku od rezultata dobivenih istraživanjem *in vitro*, u ovom slučaju nastupila je značajna destabilizacija lizosomske membrane nakon 48 sati izlaganja. Na kraju izlaganja, vrijeme zadržavanja neutralnog crvenila smanjilo se u rasponu od 37 do čak 70%. Na temelju toga može se zaključiti da ovaj spoj stanicama uzrokuje stres.

U ova dva različita pristupa istraživanju toksičnosti triklosana na školjkaše, jasno je da TCS ima snažan genotoksični učinak na hemocite. Zanimljivo je da učinak triklosana na stabilnost lizosomske membrane nije uočen u istraživanju *in vitro*, dok je u istraživanju *in vivo* uočen učinak na stabilnost lizosomske membrane. Ovakvi rezultati sugeriraju da TCS na lizosome djeluje izvanstaničnim oksidacijskim stresom do kojeg dolazi metaboličkim putovima koji se ne mogu predvidjeti eksperimentima *in vitro*. Autori smatraju da je oksidacijski stres glavni uzrok toksičnosti triklosana. On rezultira povećanjem oštećenja DNA, na što je ukazao komet-test. Oštećenje DNA može rezultirati nastajanjem mikronukleusa ili ulaženjem stanice u proces apoptoze. Također istraživači u radu predlažu mogućnost da TCS djeluje kao DNA-adukt i/ili interkalirajući agens te da na taj način ima direktan genotoksični učinak.

4.3. PARACETAMOL

Paracetamol (PCM) je spoj kemijske formule $C_8H_9NO_2$, a služi kao analgetik i antipiretičko sredstvo u medicini (Sl. 10.). Koristi se za ublažavanje bolova, spuštanje temperature te liječenje prehlade i gripe. Pripada skupini nesteroidnih protuupalnih lijekova (NSAID). Iako zapravo nema protuupalno djelovanje, svejedno se pripisuje toj skupini lijekova zbog sličnog načina djelovanja. U površinskim vodama izmjerene su koncentracije ovog spoja od nekoliko $\mu\text{g/L}$. Navodi se kao jedan od najčešće detektiranih spojeva u površinskim vodama (Parolini i sur., 2010.).

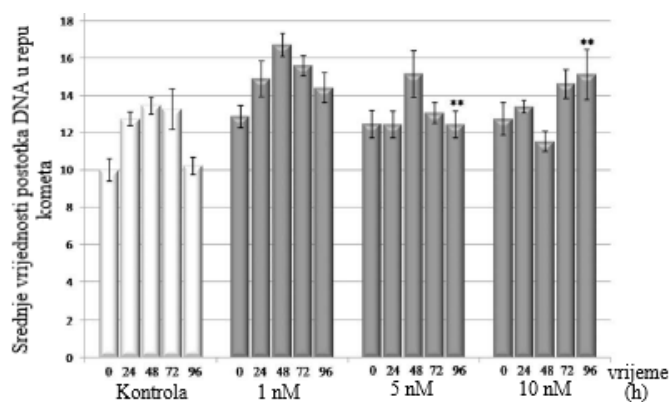


Slika 10. Strukturna formula paracetamola

(Preuzeto iz <https://www.chemsynthesis.com/base/chemical-structure-18651.html>)

Parolini i sur. (2010.) u svom su radu proučavali genotoksični učinak ovog lijeka na slatkovodnog školjkaša *Dreissena polymorpha*. Istraživanje su provodili u uvjetima *in vivo* pri različitim koncentracijama paracetamola: 1 nM (0,154 $\mu\text{g/L}$), 5 nM (0,75 $\mu\text{g/L}$) i 10 nM (1,51 $\mu\text{g/L}$). Genotoksični učinak ispitan je pomoću komet testa, MN testa, testa zadržavanja neutralnog crvenila te procjene učestalosti apoptoze.

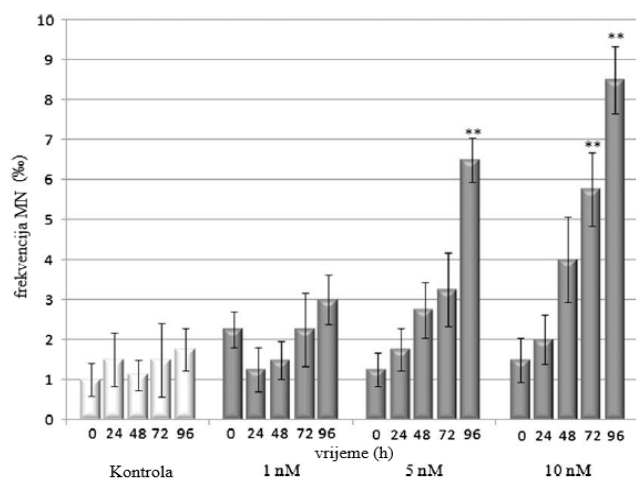
Komet-test izveden je u alkalnoj verziji prema protokolima Singh i sur. (1988.) i Buschini i sur. (2003.). Promatran je omjer između migracije (dužine repa kometa) i radijusa glave kometa (LDR) te postotka DNA u repu kometa. LDR vrijednosti nisu se značajno razlikovale između kontrolne skupine i skupina izloženih bilokoj od testiranih kocentracija. Suprotno tome, postotak DNA u repu kometa skupina izloženih paracetamolu značajno ($p < 0,01$) se razlikovao od kontrolne skupine (Sl. 11.).



Slika 11. Postotak DNA u repu kometa u ovisnosti o vremenu i koncentraciji paracetamola

(Prilagođeno prema Parolini i sur., 2010.)

Mikronukleus-test napravljen je prema protokolu Pavlica i sur. (2000.). Postojala je značajna razlika između kontrole i pojedinih testiranih koncentracija paracetamola, ali i između različitih koncentracija međusobno (Sl. 12.). Uočena je jasna veza između ispitivanih koncentracija i učinka te vremena izlaganja i učinka. Najveći porast učestalosti mikronukleusa može se primijetiti na kraju izlaganja pri koncentracijama od 5 i 10 nM.



Slika 12. Učestalost pojave mikronukleusa u ovisnosti o vremenu i koncentraciji paracetamola

(Preuzeto iz Parolini i sur., 2010.)

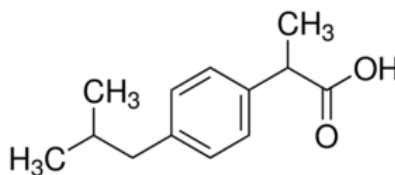
Test zadržavanja neutralnog crvenila rađen je prema protokolu Lowe i Pipe (1994.). Rezultati su pokazali da je PCM izazvao značajnu destabilizaciju lizosomske membrane. Pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji paracetamola do statistički značajnog povećanja staničnog stresa došlo je već nakon 48 sati.

Procjena učestalosti stanica u apoptozi rađena je prema istom protokolu kao i komet-test uz male preinake. Razlike u učestalosti stanica u apoptozi nisu bile značajne u usporedbi skupina izloženih paracetamolu s kontrolom. Jedina značajna razlika bila je pri najvišoj koncentraciji (10 nM) na kraju izlaganja.

Paracetamol ima genotoksičan učinak na hemocite školjkaša, ali tek pri najvišim okolišnim koncentracijama. Može se zaključiti da na početku izlaganja pri nižim koncentracijama PCM školjkaši uspješno eliminiraju ovaj farmaceutik iz svog organizma. Nakon duljeg izlaganja, PCM se počinje akumulirati u tkivima te dolazi do oštećenja genetskog materijala. Ovisno o jačini oštećenja, stanica može stvarati mikronukleuse ili u krajnjem slučaju ući u proces apoptoze. Također, biotransformacijom paracetamola nastaje metabolit N-acetil-p-benzokinonimin (NAPQI) koji povećava stvaranje reaktivnih kisikovih i dušikovih spojeva. Zbog toga se smatra da izloženost paracetamolu uzrokuje oksidacijski stres.

4.4. IBUPROFEN

Ibuprofen je derivat propionske kiseline kemijske formule $C_{13}H_{18}O_2$ (Sl. 13.). Pripada u skupinu nesteroidnih protuupalnih lijekova (NSAID) te je jedan od najkorištenijih farmaceutika na svijetu. Koristi se u medicini za liječenje simptoma artritisa, smanjenje boli i vrućice. U europskim površinskim vodama izmjerene su koncentracije ovog spoja u rasponu od 0,042 do 1,26 $\mu\text{g/L}$. Veće koncentracije izmjerene su u blizini postrojenja za obradu otpadnih voda, gdje je ta vrijednost iznosila i do 84 $\mu\text{g/L}$ (Parolini i sur., 2011.).



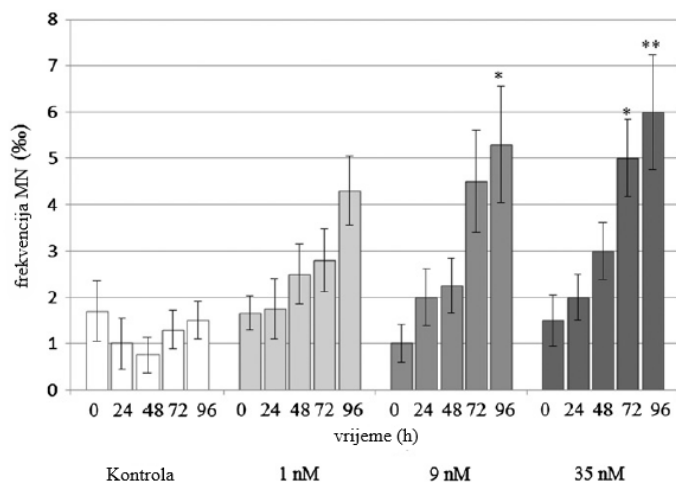
Slika 13. Strukturna formula ibuprofena

(Preuzeto iz <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/i4883?lang=en®ion=HR>)

Parolini i sur. (2011.) u svom su radu proučavali subletalni učinak ibuprofena na školjkaša *Dreissena polymorpha*. Školjkaši su tijekom 96 sati bili izloženi trima koncentracijama ibuprofena sličnima onima koje se trenutno mogu izmjeriti u okolišu: 1 nM (0,2 $\mu\text{g/L}$), 9 nM (2 $\mu\text{g/L}$) i 35 nM (8 $\mu\text{g/L}$). Genotoksični učinak istražen je komet-testom (Singh i sur., 1988., Buschini i sur., 2003.), MN-testom (Pavlica i sur. (2000.)), testom zadržavanja neutralnog crvenila (Lowe i Pipe, 1994.) te mjerenjem učestalosti stanica u apoptozi (Singh, 2000.).

Komet-test pri korištenim koncentracijama nije pokazao značajne razlike u LDR vrijednosti između kontrolne skupine i skupina izloženih ibuprofenu. Postotak DNA u repu kometa slaže se s prethodnim navodom; cca. 70% jezgara hemocita izloženih ibuprofenu pripadalo je u najniže razrede oštećenja DNA.

Mikronukleus-testom uočen je statistički značajan porast broja mikronukleusa nakon izlaganja koncentracijama od 9 (nakon 96 sati) i 35 nM (nakon 72 i 96 sati) (Sl. 14.).



Slika 14. Učestalost mikronukleusa u hemocitama školjkaša izloženih ibuprofenu

(Preuzeto iz Parolini i sur., 2011.)

Test zadržavanja neutralnog crvenila prikazao je negativno djelovanje ibuprofena na stabilnost lizosomskih membrana. Statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu primjećena je već pri koncentraciji od 1 nM. Povećanje staničnog stresa pratilo je povećanje koncentracije ibuprofena. Pri najvećoj testiranoj koncentraciji ibuprofena (35 nM) smanjenje mogućnosti retencije boje smanjila se za 88% nakon 96 sati izlaganja.

Procjena učestalosti stanica u apoptozi ukazala je na povezanost porasta broja stanica u apoptozi i vremena izloženosti te koncentracije ibuprofena. Pri najvišoj koncentraciji (35 nM), količina stanica u apoptozi udvostručila se u odnosu na kontrolnu skupinu.

Testiranje učinka okolišnih koncentracija ibuprofena pokazalo je da pri akutnom izlaganju ne dolazi do značajne fragmentacije DNA. Međutim, te su koncentracije ipak dovoljne da oštete DNA, što je vidljivo iz povećanja broja mikronukleusa i stanica u apoptozi nakon izlaganja. Kako srednja koncentracija ibuprofena korištena u tom radu odgovara stvarnim koncentracijama izmjerenim u blizini postrojenja za obradu opasnih voda, zajednice školjkaša i ostalih vodenih organizama na tim područjima mogle bi biti ozbiljno ugrožene.

5. ZAKLJUČAK

Potrošnja lijekova i proizvoda za osobnu njegu (PPCP) je toliko velika da se njihove koncentracije mogu izmjeriti u površinskim vodama diljem svijeta. Poznavanje njihovog potencijalnog štetnog djelovanja na akvatičke organizme potrebno je kako bi se mogao provoditi kvalitetan biomonitoring. Najugroženije su zajednice organizama koje se nalaze neposredno uz postrojenja za obradu otpadnih voda, gdje su izmjerene najviše koncentracije različitih farmaceutika.

Učinak farmaceutika kao toksikanata može se dobro istraživati na školjkašima. Oni imaju bitnu ulogu u vodenim ekosustavima zbog čega je istraživanje njihove sudbine od velike važnosti. Dobri su modelni organizmi jer su dovoljno osjetljivi na okolišne stresore, sesilni su, hrane se filtracijom te su podložni bioakumulaciji toksičnih tvari u tkivima.

Većina eksperimenata temelji se na akutnim izlaganjima pri visokim koncentracijama spojeva koje se u prirodi ne mogu naći. Takvi testovi nisu dovoljno osjetljivi i ne daju kompletnu sliku o stvarnom učinku tih spojeva na zajednice organizama. Kako bi se bolje razumio utjecaj farmaceutika na pojedine organizme, potrebno je raditi detaljnija istraživanja. Istraživanja *in vitro* trebala bi služiti kao preliminarno testiranje potencijalnog štetnog učinka nekog spoja te dati uvid u njegove mehanizme djelovanja. Zatim bi bilo potrebno provesti istraživanje *in vivo* kako bi se dobila realnija slika o utjecaju tog spoja na organizam. U tom slučaju vrlo je važno pravilno izabrati koncentracije spoja koje će se testirati. Potrebno je uzeti u obzir one koncentracije koje odgovaraju stanju u okolišu. Najtočniji podaci dobili bi se izlaganjem jedinki mješavinama različitih farmaceutika koji se u okolišu često javljaju zajedno. Takva istraživanja mogla bi se dodatno potvrditi terenskim istraživanjima gdje bi se jedinke kroz dulji vremenski period izlagale *in situ*. Takvih je istraživanja za sada vrlo malo.

Proučavanjem učinka fluoksetina, triklosana, paracetamola i ibuprofena, može se zaključiti da ovi često korišteni farmaceutici imaju visok genotoksični potencijal. Iako se veća oštećenja javljaju tek pri koncentracijama znatno višim od onih izmjerenih u okolišu, takvi rezultati mogu nam dati uvid u način djelovanja takvih spojeva te pridonijeti lakšem odabiru spojeva koje treba detektirati pri procjeni stanja vodenih okoliša i biomonitoringu.

6. LITERATURA

- Benfield, P., Heel, R. C., Lewis, S. P., 1986.: Fluoxetine, A review of its pharmacodynamics and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in depressive illness, *Drugs*, 32, 481-508.
- Binelli, A., Cogni, D., Parolini, M., Riva, C., Provini, A., 2009a: Cytotoxic and genotoxic effects of *in vitro* exposure to Triclosan and Trimethoprim on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) hemocytes, *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 150, 50-56.
- Binelli, A., Cogni, D., Parolini, M., Riva, C., Provini, A., 2009b: *In vivo* experiments for the evaluation of genotoxic and cytotoxic effects of Triclosan in Zebra mussel hemocytes, *Aquatic Toxicology*, 91, 238-244.
- Bringolf, R. B., Heltsley, R. M., Newton, T. J., Eads, C. B., Fraley, S. J., Shea, D., Cope, W. G., 2010.: Environmental occurrence and reproductive effects of the pharmaceutical fluoxetine in native freshwater mussels, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29, 1311-1318.
- Brooks, B. W., Foran, C. M., Richards, S. M., Weston, J., Turner, P. K., Stanley, J. K., Solomon, K. R., Slattery, M., La Point, T. W., 2003.: Aquatic ecotoxicology of fluoxetine, *Toxicology Letters*, 142, 169-183.
- Buschini, A., Carboni, P., Martino, A., Poli, P., Rossi, C., 2003.: Effects of temperature on baseline and genotoxicant-induced DNA damage in haemocytes of *Dreissena polymorpha*, *Mutation Research*, 537, 81-92.
- Habdija, I., Primc Habdija, B., Radanović, I., Špoljar, M., Matoničkin Kepčija, R., Vujčić Karlo, S., Miliša, M., Ostojić, A., Sertić Perić, M., 2011.: Protista- Protozoa, Metazoa- Invertebrata, *Strukture i Funkcije, Alfa*, 216-223, 261-271.

- Hazelton, P. D., Du, B., Haddad, S. P., Fritts, A. K., Chambliss, C. K., Brooks, B. W., Bringolf, R. B., 2014.: Chronic fluoxetine exposure alters movement and burrowing in adult freshwater mussels, *Aquatic Toxicology*, 151, 27-35.
- Lacaze, E., Pédelucq, J., Fortier, M., Brousseau, P., Auffret, M., Budzinski, H., Fournier, M., 2015.: Genotoxic and immunotoxic potential effects of selected psychotropic drugs and antibiotics on blue mussel (*Mytilus edulis*) hemocytes, *Environmental Pollution*, 202, 177-186.
- Lowe, D. M., Pipe, R. K., 1994.: Contaminant induces lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells: an in vitro study, *Aquatic Toxicology*, 30, 357-365.
- Parolini, M., Binelli, A., Provini, A., 2011.: Chronic effects induced by ibuprofen on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, 1586- 1594.
- Parolini, M., Binelli, A., Cogni, D., Provini, A., 2010.: Multi-biomarker approach for the evaluation of the cyto-genotoxicity of paracetamol on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*), *Chemosphere*, 79, 489-498.
- Pavlica, M., Klobučar, G. I. V., Vetma, N., Erben, R., Papeš, D., 2000.: Detection of micronuclei in haemocytes of zebra mussel and ramshorn snail exposed to pentachlorophenol, *Mutation Research*, 465, 145-150.
- Roell, K. R., Reif, D. M., Motsinger-Reif, A. A., 2017.: An introduction to terminology and methodology of chemical synergy- perspectives across disciplines, *Frontiers in Pharmacology*, 8.
- Singh, N. P., 2000.: Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis, *Mutation Research*, 455, 111-127.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E., 1988.: A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research*, 175, 184-191.

Web stranice:

1. <https://www.chemsynthesis.com/base/chemical-structure-18651.html>
2. <https://echa.europa.eu/information-on-chemicals/ec-inventory>
3. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/i4883?lang=en®ion=HR>

7. SAŽETAK

Farmaceutici su raznolika skupina spojeva koji se koriste u svrhu liječenja te prevencije bolesti u ljudi, ali se koriste i u veterini, akvakulturi i stočarstvu. Mjerljive koncentracije ovih spojeva izmjerene su u površinskim vodama diljem svijeta, zbog čega lijekovi i proizvodi za osobnu njegu (PPCP) odnedavno postaju predmetom njihovog istraživanja kao okolišnih zagađivača. Kada se takvi spojevi nađu u okolišu, mogu djelovati na usporedljive biokemijske mehanizme drugih organizama koji nisu bili njihova ciljana meta. Zbog razlika u fiziologiji, ovakvi spojevi mogu biti vrlo toksični za beskralježnjake.

U ovom radu obrađen je učinak četiriju često detektiranih farmaceutika u vodenim okolišima, fluoksetina, triklosana, paracetamola i ibuprofena, na školjkaše. Sva četiri spomenuta spoja imaju genotoksični učinak na hemocite školjkaša pri višim koncentracijama. Štetni učinci ovih spojeva mogu se pratiti i pri znatno nižim, okolišnim koncentracijama. Zbog činjenice da farmaceutici opstaju u vodi i nakon njenog pročišćavanja, najugroženije zajednice organizama su upravo one koje žive u blizini postrojenja za obradu otpadnih voda.

8. SUMMARY

Pharmaceuticals are a diverse group of chemicals that are used for treating and preventing diseases in people, but are also used in veterinary medicine, aquaculture and agriculture. Measurable concentrations of certain pharmaceuticals have been found in surface waters all over the world, which is why pharmaceuticals and personal care products (PPCSs) are recently being investigated as environmental pollutants. When these chemicals end up in the environment, they can affect comparable pathways of non-target organisms. Due to differences in physiology, these molecules can be highly toxic for invertebrates.

In this work, the effect of widely used pharmaceuticals on bivalves was reviewed. All four of mentioned pharmaceuticals, fluoxetine, triclosan, paracetamol and ibuprofen have shown a genotoxic effect on bivalve haemocytes. Harmful effects of these pharmaceuticals can be detected even at environmental concentrations. Due to the persistence of pharmaceuticals after wastewater treatments, the most vulnerable populations of organisms are those living near wastewater treatment plants.